

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer:

0 155 237
A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 85810103.3

(51) Int. Cl.: C 12 M 3/02, C 12 M 1/12

(22) Anmeldetag: 11.03.85

(30) Priorität: 15.03.84 DE 3409501

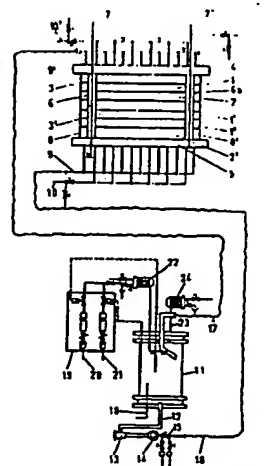
(71) Anmelder: MBR Bio Reactor AG, Werkstrasse 3/4,
CH-8620 Wetzikon (CH)(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung: 18.09.85
Patentblatt 85/38(72) Erfinder: Kättinger, Hermann, Dr.,
Heiligenstädterstrasse 133, A-1190 Wien (AT)
Erfinder: Schelrer, Winfrid, Gartengasse 8,
A-2351 Wiener Neudorf (AT)(84) Benannte Vertragsstaaten: AT BE CH DE FR GB IT LI LU
NL SE(74) Vertreter: Herrmann, Peter Johannes et al, c/o PPS
Polyvalent Patent Service AG Mellingerstrasse 1,
CH-5400 Baden (CH)

(54) Verfahren und Vorrichtung zum Kultivieren von humanen, tierischen, pflanzlichen sowie hybriden Zellen und Mikroorganismen.

(57) In einem Verfahren zur Kultivierung von Gewebezellen und Mikroorganismen werden wenigstens drei aneinander liegende Kammern durch Membranen (A, B) voneinander getrennt. In einer Zellzuchtkammer (1) befinden sich die immobilisierten Zellen. Es wird lediglich durch eine Membran (A) getrenntes Nährmedium über eine Mediumkammer (2) zirkuliert und ein Produkt über eine Membran (B) und eine Produktkammer (3) abgezogen.

Die Vorrichtung zur Durchführung der Verfahrens besteht aus wenigstens einer Zellzuchtkammer (1) einer Mediumkammer (2) und einer Produktkammer (3), welche durch Membranen (A, B) voneinander getrennt sind. Die Zellzuchtkammer (1) enthält Gewebe (25) zur Immobilisierung von Zellen. Es kann eine beliebige Anzahl von Kammern zu einer Zellzuchtvorrichtung zusammengestellt werden.

Die Erfindung ermöglicht eine schonende Kultivierung von Gewebezellen und eine hohe Volumenausnutzung.



5233 EPA

EP 0 155 237 A2

0155237

- 1 -

Verfahren und Vorrichtung zum Kultivieren von humanen, tierischen, pflanzlichen sowie hybriden Zellen und Mikroorganismen

- Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zum Kultivieren von humanen, tierischen, pflanzlichen sowie hybriden Zellen und Mikroorganismen in einem Bioreaktor mit wenigstens drei aneinander anliegenden Kammern, wobei we-
- 5 nigstens eine erste Kammer eine Zellzuchtkammer eine zweite Kammer eine Mediumkammer und eine dritte Kammer eine Produktkammer ist und die einzelnen Kammern von einander durch Membranen begrenzt sind.
- Zellen höherer Eukaryonten (tierische Zellen, humane Zellen,
- 10 Pflanzenzellen und Mikroorganismen) sind in vitro durch folgende Eigenschaften charakterisiert:
- Wachstum in komplexen Nährmedien.
 - Hohe Empfindlichkeit gegenüber mechanischen und hydraulischen Schereffekten.
 - 15 - Hohe Empfindlichkeit gegenüber physikalischen und chemischen Umwelteinflüssen.
 - Weitgehende Abhängigkeit von einer ausgeglichenen Versorgung mit Nährstoffen und Entsorgung der Stoffwechselprodukte.
 - 20 - Die Kinetik der Produktbildung kann sowohl an das Zellwachstum gebunden sein als auch unabhängig davon erfolgen.

0155237

- 2 -

- Die Produkte werden entweder ausgeschieden oder sind zellassoziert.

Bei der Züchtung von Zellen werden diese mit Nährstoffen aus dem sie umgebenden Nährmedium versorgt. Die Stoffwechselprodukte der Zellen werden in das Medium abgegeben. Wenn das
5 die Zellen enthaltende flüssige Nährmedium in einem Behälter ruhig steht, so setzen sich die Zellen wegen ihres grösseren spezifischen Gewichtes am Behälterboden ab und/oder lagern sich an den Behälterwänden an. Die sich daraus ergebenden
10 hohen Zelldichten haben zur Folge, dass die Diffusion zum Nährstoffnachschub bzw. zur Entsorgung von Stoffwechselprodukten nicht ausreicht und die Zellen absterben. Darüber hinaus ist zur Erlangung von hohen Zelldichten, wie sie bei Produktionsprozessen vielfach gewünscht werden, ein Nach-
15 schub und/oder ein Austausch bzw. eine Regenerierung des Mediums notwendig. Üblicherweise muss daher die Zellsuspension entweder in sehr dünnen Schichten kultiviert werden oder für eine ständige Aufrechterhaltung einer Suspension gesorgt werden, bzw. müssen die Zellen beim Mediumnachschub oder Me-
20 diumtausch kurzfristig vom Medium separiert werden.

Im Zusammenhang mit der geringen mechanischen und chemischen Belastbarkeit der Zellen ergeben sich aus den notwendigen Massnahmen wie Rühren, Füllen, Zentrifugieren, Filtrieren, Sterilhalten usw. grosse Probleme bei der Übertragung sol-
25 cher Kultivierungsverfahren vom Labormassstab zur technischen und grosstechnischen Anlage.

Bei allen bekannten Verfahren, bei denen Nährstoffe über semipermeable Membranen zugeführt oder Stoffwechselprodukte über solche Membranen abgeführt werden, werden die Zellen
30 zusammen mit einem Kulturmedium bewegt, was in der Regel durch Umpumpen erfolgt. Das Umpumpen von Zellen führt jedoch zu einer mechanischen Beanspruchung der Zellen, welche dadurch geschädigt werden.

0155237

Aufgabe der Erfindung ist es, unter weitgehend natürlichen Bedingungen, die Zufuhr von Nährstoffen und die Abfuhr von Stoffwechselprodukten unter Vermeidung von mechanischen und chemischen Einflüssen zu erzielen.

- 5 Die vorgenannte Aufgabe wird erfindungsgemäss dadurch gelöst, dass eine Nährlösung enthaltende Mediumkammer in ihrer Längsrichtung durchströmt wird und dass die Zellzuchtkammer sowie die daran anschliessende Produktkammer mit ihrem Inhalt sich in relativer Ruhe zur Strömungsgeschwindigkeit der
- 10 Nährlösung befinden.

Die Zellen werden in einer Zellzuchtkammer kultiviert, deren Raum durch die beiden gegenüber liegenden Membranen und durch zusätzliche Haltevorrichtungen, Anschlüsse usw. begrenzt wird.

- 15 Auf der Aussenseite der Membranen der Zellzuchtkammer befinden sich ebenfalls Kammern, die mit Nährmedium ganz oder teilweise gefüllt sind. Die Nährmediumzufuhr erfolgt vorzugsweise durch die Poren der Membrane entweder durch Diffusion oder durch Massenfluss. Eine direkte Nährmediumzufuhr
- 20 in die Zellzuchtkammer ist gleichfalls möglich. Ebenso können Produkte der Zellen durch die Membranen abgeführt aber auch - wählbar durch die Durchlässigkeit der Membrane - im Kulturraum zurückgehalten werden. Die Medien können kontinuierlich oder diskontinuierlich durch die Kammern geführt
- 25 werden, wobei das Medium ausserhalb oder innerhalb der Mediumkammern konditioniert (chemisch oder physikalisch behandelt usw.) werden kann.

- Von besonderem Vorteil ist die Fixierung der Zellen an Trägerelemente, bevorzugt an Gewebe in Form von Netzen. Das hat
- 30 den Vorteil, dass zur Fixierung der Zellen keine Biocarrier benötigt werden, sondern das Netz selbst als Zellcarrier verwendet wird.

Zur Durchführung des Verfahrens ist es, gemäss Anspruch 3 zweckmässig, eine Zellzuchtkammer über je eine Membran sowohl mit einer Produktkammer als auch mit einer Nährmediumkammer zu verbinden.

- 5 Die Kulturkammern können als Stapel mit gemeinsamen Zu- und Ablaufkanälen aufgebaut werden, wobei entweder ein Zweikammersystem (Medium/Zellen) oder ein Dreikammersystem (Medium/Zellen/Produkt) als minimale funktionelle Einheit angewendet werden kann. Die Anzahl der Kammern in einem Stapel
10 kann jedoch beliebig gewählt werden. Die Fläche der Kulturkammern ist durch die produktionsbedingte Maximalgrösse der Membranen begrenzt.

- 15 In einer Zellzuchtkammer können zwei Membranen mit unterschiedlicher Porengrösse verwendet werden. Dabei ist die Porengrösse der Membran zwischen Zellen und Nährmedium so zu wählen, dass ein Nährstofftausch stattfinden kann und die Membran zwischen den Zellen und der Produktkammer, dass lediglich die Stoffwechselprodukte auf die Produktseite hindurchtreten können.

- 20 Die Membranen können aus jedem brauchbaren Material bestehen und jede Porengrösse aufweisen. Sie können symmetrisch oder asymmetrisch, polar oder unpolar, hydrophil oder hydrophob sein und müssen in ihrer Stärke dem System angepasst werden. Die Membranen müssen jedoch so beschaffen sein, dass im
25 wesentlichen die Zellen zurückgehalten werden. Es gelten die genannten Kriterien auch für gaspermeable Membranen. Die Höhe der Kammer zwischen den bevorzugt horizontal liegenden Membranen ist durch die Nährmediumzufuhr und die gewünschten Zelldichten begrenzt. Die Kulturkammer kann mit Einbauten
30 zum Stützen der Membranen und/oder zur Erzeugung von Konvektion und/oder zur kontrollierten Leitung der Suspension versehen werden. Die Mediumkammern sind in ihren Volumina nur durch den gewünschten Durchfluss bzw. durch die Leiteinrich-

tungen zur Steuerung der Konvektion und der Strömung sowie das gewünschte Volumen begrenzt.

Der Gesamtaustausch (Ver- und Entsorgung) von Gasen, wie O₂, CO₂ usw., kann entweder durch externe oder interne Anreicherung im Kulturmedium in gelöster Form oder als Gas/Flüssigkeits-Dispersion erfolgen, aber auch durch gaspermeable Membranen beliebiger Form durchgeführt werden. Dies kann entweder analog zu den Medienströmen oder durch Einsatzmembranen, z.B. schlauchförmige Membranen, die durch die Kulturkammern geführt werden und gleichzeitig als Stütznetze der Flachmembranen und/oder Träger der Zellen dienen, erfolgen.

Es hat sich, gemäss Anspruch 4, als günstig erwiesen, die Membranen zwischen dem Medium und der Zellzuchtkammer in ihrer Porengrösse so zu wählen, dass Stoffe mit Teilchen, die 100'000 Dalton übersteigen, nicht mehr durch die Membranen passieren können.

Für die Membranen zwischen der Produktkammer und der Zellzuchtkammer, gemäss Anspruch 5, ist es zweckmässig, eine Porengrösse zu wählen, die zwischen 0,1 µm und 0,6 µm, vorzugsweise 0,2 µm beträgt.

Gemäss Anspruch 6 ist es zweckmässig, die Membranen innerhalb der Zellzuchtkammer in einem Abstand von 0,3 bis 10 mm anzubringen. Es hat sich als besonders vorteilhaft erwiesen, den Abstand beider Membranen mit 0,5 mm zu wählen, da die als Träger für die Zellen dienenden Netze auch 0,5 mm dick sind und so mit ihrer Textur die ganze Zellzuchtkammer ausfüllen.

Nach Anspruch 7 ist es zweckmässig, Mess-Sonden in die Leitungen einzuführen, welche zum Einbringen der Zellsuspension und zur Ernte dienen. Diese Leitungen führen rechtwinklig durch alle Kammern hindurch, wobei der Kopf eines Messfühlers etwa in der Mitte einer Zellzuchtkammer fixiert ist. Es

sind insbesondere Sonden für pH, pO₂ vorgesehen.

Zur Fixierung der Sonden haben sich, gemäss Anspruch 8, Feststellbolzen als besonders geeignet erwiesen, welche von der Gegenseite der Leitung so eingeführt und befestigt sind, dass sie die Lage der Mess-Sonden begrenzen. Durch den Feststellbolzen wird das Totvolumen im Leitungsrohr zur oder von der Zellzuchtkammer verringert.

Als besonders vorteilhaft zum Immobilisieren von Zellen, haben sich als Träger, gemäss Anspruch 9, Gewebe erwiesen, welche eine netzförmige Textur aufweisen.

Als Zellträgernetze sind, gemäss Anspruch 10, Netze aus Kunststoffen, insbesondere aus Fluorkohlenwasserstoffen geeignet.

Gemäss Anspruch 11, sind Netze mit rautenförmigen Öffnungen vorteilhaft. Hierbei setzen sich die Zellen um die Gewebefäden fest und lassen eine mittige Öffnung für den Stoffaustausch frei.

Die Erfindung soll anhand von Zeichnungen beispielhaft näher beschrieben werden.

Es zeigt:

Fig. 1 ein Prinzipschema des Verfahrens mit einem Aufriss durch die Vorrichtung gemäss der Erfindung,

Fig. 2 einen Grundriss durch die Zellzuchtvorrichtung gemäss Fig. 1,

Fig. 3 einen Schnitt A-A gemäss Fig. 2,

Fig. 4 einen Schnitt B-B gemäss Fig. 2,

0155237

- 7 -

Fig. 5 eine Anordnung der Sonden in der Zellzuchtkammer,

Fig. 6 eine Vergrößerung im Bereich der Befestigung der Membranen,

5 Fig. 7 eine schematische Darstellung eines Zweikammersystems,

Fig. 8 ein Schema eines Dreikammersystems und

Fig. 9 ein perspektivischer Einblick in den Aufbau der Zellzuchtvorrichtung.

10 Gemäss Fig. 1 besteht eine Zellzuchtvorrichtung in ihrer einfachsten Ausführung aus je einer Zellzuchtkammer 1, welche von einer Mediumkammer 2, und einer Produktkammer 3 eingeschlossen wird. In Fig. 1 sind weitere Zellzuchtkammern 1', 1'', eine weitere Mediumkammer 2' und eine weitere Produktkammer 3' gezeigt. Die Vorrichtung ist je nach den Bedürfnissen beliebig erweiterungsfähig. Die drei Kammern werden durch eine Deckplatte 4 und eine Bodenplatte 5 begrenzt. Die einzelnen Kammern sind durch Membranen und an diesen randseitig angebrachten Dichtungen steril abgedichtet. In einer Leitung 6 zur Zellenzufuhr und Zellenernte sind Sonden 7 bzw. 7' zur Messung bzw. Steuerung von pH und pO₂ vorgesehen. Zur Fixierung der Sonden innerhalb beispielsweise in der Zellzuchtkammer 1' sind Feststellbolzen 8 bzw. 8' vorgesehen. Die Zellzuchtvorrichtung ist mit Anschlüssen 9, 9' für ein Nährmedium sowie mit Anschlüssen 10, 10' für das Produkt versehen. Ein Behälter 11 zur Aufbereitung des Nährmediums ist über eine Leitung 12, ein Dosierventil 13, eine Pumpe 14, ein Ventil 15 und eine flexible Leitung 16 mit dem Anschluss 9 an der Zellzuchtvorrichtung verbunden. Über eine Leitung 17 wird das zirkulierende Medium in den Behälter 11 zurückgeführt. Der Behälter 11 ist mit einer Temperaturregelung 18 verbunden sowie einer Begasungseinrichtung 19. Die Begasungsstation 19 beinhaltet eine

15

20

25

30

0155237

- 8 -

Zufuhrleitung 20 für Luft und eine Zufuhrleitung 21 für Kohlenstoffdioxid. Zwischen der Begasungsstation 19 und dem Behälter 11 ist ein Zuluftfilter 22 und in der Abluftleitung 23 ein Abluftfilter 24 vorgesehen.

- 5 Fig. 2 zeigt den Grundriss der Zellzuchtvorrichtung gemäss Fig. 1 mit der Bodenplatte 5, dem Anschluss 9 für die Mediumzufuhr und dem Anschluss 9' für die Mediumabfuhr von und zu den Mediumkammern 2 und 2' sowie die Anschlüsse 6' und 6" zu den Zellzuchtkammern 1, 1', 1".
- 10 In Fig. 3 ist die Zellzuchtkammer 1, die Mediumkammer 2 und die Produktkammer 3 zwischen der Deckplatte 4 und der Bodenplatte 5 befestigt. Zwischen der Zellzuchtkammer 1 und der Mediumkammer 2 ist eine Membran A und zwischen der Produktkammer 3 eine weitere Membran B vorgesehen. Die Mediumzufuhr erfolgt über den Anschluss 9 und die Mediumabfuhr über den
- 15 Anschluss 9'. Der Anschluss 10 ist für den Produkteintritt und der Anschluss 10' für den Produktaustritt vorgesehen. Sowohl der Mediumstrom als auch der Produktstrom sind durch mit Pfeilen vorgesehenen punktgestrichelten Linien angedeutet.
- 20 In Fig. 4 ist der Anschluss 6' für den Eintritt der Zellsuspension und der Anschluss 6" für den Austritt der Zellsuspension vorgesehen. Hier ist der Weg der Zellsuspension gleichfalls durch eine strich-punktierte Linie wiedergegeben.
- 25 In Fig. 5 ist die Anordnung von Sonden 7, 7' im Eintrittsstutzen 6' und Austrittsstutzen 6" der Zellzuchtkammer 1 gezeigt, die zur Fixierung in ihrer Eindringtiefe von den Feststellbolzen 8 und 8' begrenzt sind. Ein Messkopf 7a befindet sich in der Mitte der Zellzuchtkammer 1.
- 30 In Fig. 6 ist die Befestigung der Membranen A, B und von Geweben 25, 25', welche zur Immobilisierung der Zellen oder Mi-

kroorganismen dienen, gezeigt. Die Befestigung erfolgt durch Zusammenklemmen an der Peripherie, wobei auf den Geweben aufgebracht^s Dichtungsmaterial 27,27' und 28,28' gleichzeitig als Distanzhalterung dient.

5 Fig. 7 zeigt das Schema eines Zweikammersystems, wobei Nährstoffzufuhr und Produktabfuhr über gleichartige Membranen A erfolgen. Das Nährmedium zirkuliert über die Anschlüsse 9 mit Abzweigungen in die Mediumkammern 2,2',2'',2''' zum Anschluss 9'. Die Zellzuchtkammern 1,1',1'' sind mit Membranen
10 A versehen. Die Zellen werden über den Anschluss 6' in die Zellzuchtkammern eingebracht und nach beendeten Wachstum oder aus anderen Gründen über den Anschluss 6'' geerntet.

In Fig. 8 erfolgt die Mediumzufuhr und Produktabfuhr in gleicher Weise wie in Fig. 7. Die Zellzuchtkammern hingegen
15 sind durch entsprechende Rohrverbindungen hintereinander geschaltet.

Fig. 9 zeigt eine geöffnete Zellzuchtkammer mit der Deckplatte 4 und der Bodenplatte 5. Zwischen den Membranen A und B sind Gewebe 25 mit der erfindungsgemässen Textur versehen,
20 die gleichzeitig als Stützgewebe für die Membranen und als Träger 25 bzw. 25' für die Zellen dienen.

Die Betriebsweise wird anhand von Fig. 1 erläutert. Nach dem Zusammenbau einer Zellzuchtvorrichtung bestehend aus den Zellzuchtkammern 1,1',1'', den Mediumkammern 2,2', den Produktkammern 3,3' sowie der Deckplatte 4 und der Bodenplatte
25 5, des weiteren den Membranen A und B sowie die in den Zellzuchtkammern 1,1',1'' zwischen den Membranen befestigten Netzen (Fig. 9), wird die Apparatur auf Dichtigkeit geprüft und in bekannter Weise mit Dampf sterilisiert. Zur Immobilisierung der Zellen wird eine Zellsuspension über die Leitung
30 6 der linken Seite die Zellzuchtkammern 1,1',1'' und die Ausgangsleitung 6a auf der rechten Seite der Vorrichtung über ein entsprechendes nicht gezeigtes Impfgefäss so lange zirkulieren

0155237

- 10 -

liert, bis alle Zellen auf den Netzen fixiert sind.

Gleichzeitig wird eine im Behälter 11 bereitete sterile Nährlösung als Medium mittels der Pumpe 14, über die Leitung 16, den Anschluss 9, die Mediumkammern 2 und 2', die Sammel-

5 leitung 9', Leitung 17 in den Behälter 11 rezirkuliert. Die Menge des Medienstroms wird mit dem Ventil 13 eingestellt. Die Begasung des Nährmediums erfolgt mittels der Begasungseinrichtung 19, welche eine Dosiereinheit für die Zugabe von Luft über die Leitung 20 und CO₂ über die Leitung 21 vor-

10 sieht. Diese Gase werden vor dem Eintritt in den Behälter 11 über das Zuluftfilter 22 sterilfiltriert. Die Abgase aus dem Behälter 11 können über das Abluftfilter 24 entweichen.

Über den Anschluss 10 kann produktseitig eine geeignete Flüssigkeit beispielsweise für den kontinuierlichen Abtransport der Stoffwechselprodukte aus den Zellzuchtkammern 1, 1', 1" geleitet werden. Diese durchströmt die Produktkammern 3 und 3' und verlässt die Zellzuchtvorrichtung über den Anschluss 10'. Das Produkt kann aber auch diskontinuierlich abgezogen werden, wobei während des Zellzuchtbetriebs die

15 Ventile zu den Anschlüssen 10 und 10' geschlossen bleiben, bis sich durch die Permeation durch die Membranen in den Produktkammern 3 und 3' genügend Produkt angesammelt hat, welches unter Druck steht und über die Leitung 10' im Be-

20 darfs- bzw. Erntefall abgezogen werden kann.

25 Die Betriebsweise der Kulturkammern lässt sich auf die jeweilige Produktionskinetik optimal abstimmen. Dies wird dadurch gewährleistet, dass eine Immobilisierung der Zellen in einem gewünschten Ausmass erreicht wird und sowohl die Zell-

30 seite als auch die Medium- und gegebenenfalls die Produktseite getrennt kontinuierlich oder diskontinuierlich durchströmt werden können. Die Vorteile der bekannten Verfahren der Zellimmobilisierung, der Dialysekultur und der Perfusionskultur können mit der Methode der Batchkultur, der einströmigen und mehrströmigen kontinuierlichen Betriebsweise

dadurch kombiniert werden. Es ist daher möglich, für jede beliebige Produktionskinetik die optimale Betriebsweise zu wählen. Es kann das erfindungsgemässe Verfahren für biokatalytische Umwandlungen von Substraten zu Produkten verwendet werden. Das erfindungsgemässe Verfahren ergibt eine leichtere Bearbeitbarkeit und bessere Kontrollierbarkeit sowie die Möglichkeit der kontrollierten Durchströmung und der Messwerterfassung im Kulturraum. Im Vergleich zum komplizierten Verfahren der Mikroverkapselungstechnik gewährleisten weit einfachere und kleinere Anlagen eine bessere Kontrollierbarkeit und liefern dabei gleich gute oder bessere Ergebnisse.

Beispiel:

Die Kulturkammern werden mit Polysulfon von 0,2 μm Porengrössen bestückt, die Zu- und Ablaufkanäle von Kultur- und Mediumkammern parallel zusammengefasst und der Apparat sterilisiert.

Die Kulturkammern werden mit einer Zellsuspension der Hybridom-Zelllinie C28 befüllt. Es ist dies eine Hybridomzelllinie zwischen primären Humanzellen und einer Mäusemyelomzelllinie. Sie produziert humanes IgG1 und scheidet dieses in das umgebende Medium aus. Dieses Kulturmedium besteht aus 90 % Dulbecco's MEM und 10 % foetalem Kalbserum. Die Startzell-dichte beträgt 500'000 Zellen/ml. Die Kultivierungstemperatur ist 36,5 °C. In den Mediumkanälen wird Kulturmedium, das mittels einer Airliftpumpe mit Luft angereichert wird, umgepumpt und mit einem Volumenäquivalent des Kulturkammervolumens täglich durchströmt. Nach drei Tagen ist eine Zelldichte von $1,8 \times 10^6$ Zellen/ml erreicht, die IgG1-Konzentration auf der Mediumseite beträgt etwa 30 mg/l. Die Globulinkonzentration steigt allmählich auf etwa 100 mg/l und stabilisiert sich nach einer weiteren Woche.

Durch das erfindungsgemässe Verfahren werden den Zellen auf schonende Weise ausreichend Nährstoffe zugeführt sowie

Stoffwechselprodukte abgeführt. Ein schädlicher physikalischer oder chemischer Einfluss kann durch die Membranen von den Zellen ferngehalten werden. Durch die Anordnung der Membrankammern in Stapeln ist eine hohe Volumenausnutzung gegeben und damit die Möglichkeit, technisch relevante Kulturgrossen als Einheitsoperation zu erreichen.

0155237

- 13 -

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zum Kultivieren von humanen, tierischen
pflanzlichen sowie hybriden Zellen und Mikroorganismen
in einem Bioreaktor mit wenigstens drei aneinander an-
liegenden Kammern, wobei wenigstens eine erste Kammer
5 eine Zellzuchtkammer (1) eine zweite Kammer eine Medium-
kammer (2) und eine dritte Kammer eine Produktkammer (3)
ist und die einzelnen Kammern von einander durch Membran-
nen (A,B) begrenzt sind, dadurch gekennzeichnet, dass
eine Nährlösung enthaltene Mediumkammer (2) in ihrer
10 Längsrichtung durchströmt wird und dass die Zellzucht-
kammer (1) sowie die daran anschliessende Produktkammer
(3) mit ihrem Inhalt sich in relativer Ruhe zur Strö-
mungsgeschwindigkeit der Nährlösung befinden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass
15 die Zellen innerhalb der Zellzuchtkammer (1) an Trägern
aus netzartigen Geweben (25,25') immobilisiert werden.
3. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach den An-
sprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass wenig-
stens eine Zellzuchtkammer (1) über eine Membran (B) mit
20 einer Produktkammer (3) und über eine weitere Membran
(A) mit einer Mediumkammer (2) in Verbindung steht und
dass die Membranen (A) und die Membranen (B) unter-
schiedliche Porengrössen aufweisen.
4. Vorrichtung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet,
25 dass die Membran (A) eine Ausschlussgrenze von 100'000
Dalton aufweist.

5. Vorrichtung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet,
dass die Membran (B) eine Porengrösse von 0,2 μ m aufweist.
- 5 6. Vorrichtung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet,
dass die Membranen (A,B) in der Zellzuchtkammer (1) einen Abstand von 0,3 bis 10 mm aufweisen.
- 10 7. Vorrichtung nach den Ansprüchen 3 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass eine Mess-Sonde (7) durch einen orthogonal durch die beiden an die Zellzuchtkammer (1) anliegenden Kammern (2;3) hindurchführenden Anschlussstutzen (6') und eine weitere Mess-Sonde (7') durch einen Anschlussstutzen (6'') mit dem Messkopf (7a) innerhalb der Zellzuchtkammer (1) fixiert ist.
- 15 8. Vorrichtung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Mess-Sonden (7,7') mittels Feststellbolzen (8,8') fixiert sind.
- 20 9. Vorrichtung nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen den beiden Membranen (A,B) der Zellzuchtkammer (1) netzartige Gewebe (25,25') befestigt sind.
10. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die netzartigen Gewebe (25,25') aus Kunststoffgeweben bestehen.
- 25 11. Vorrichtung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die netzartigen Gewebe (25,25') rautenförmige Öffnungen aufweisen.

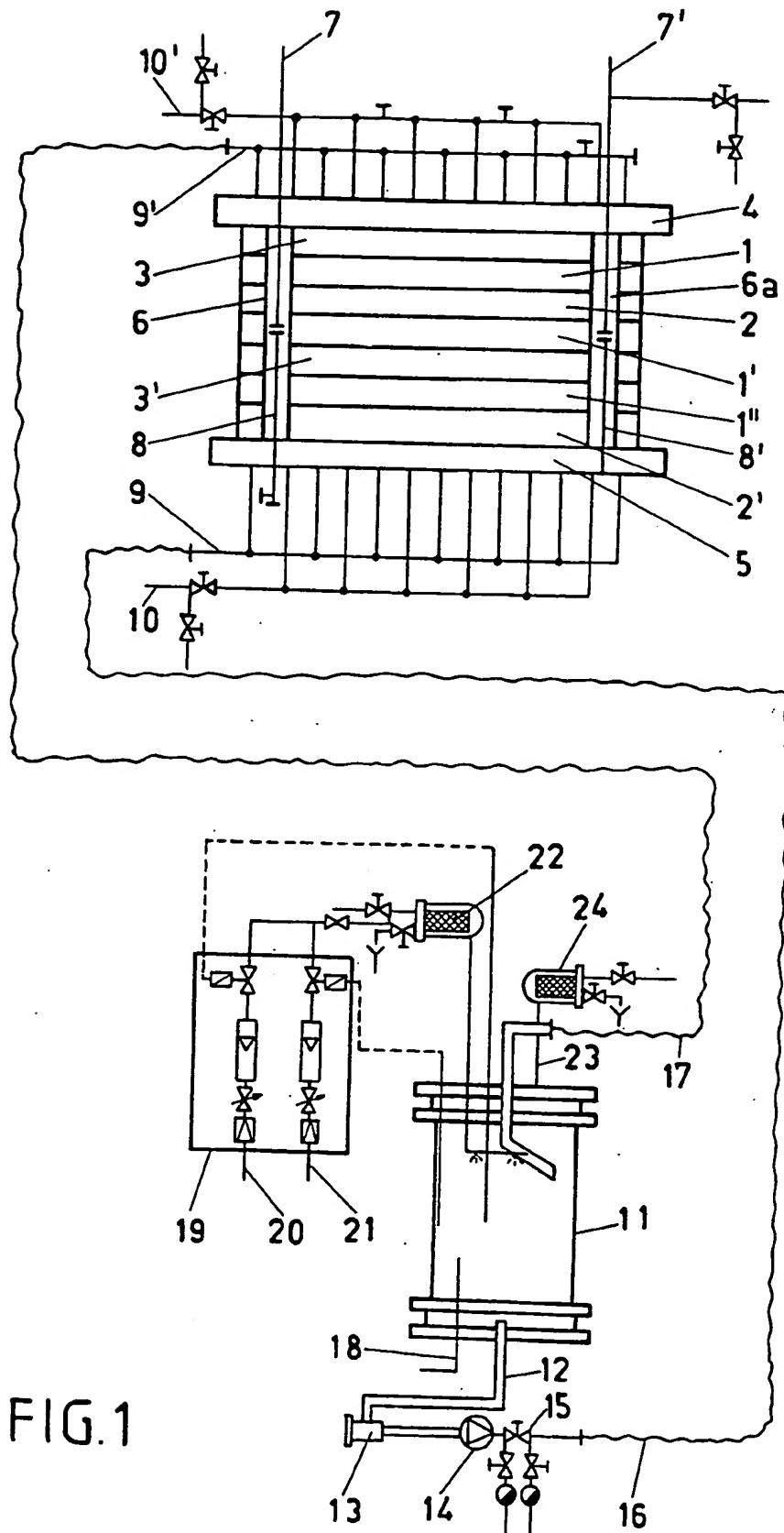


FIG.1

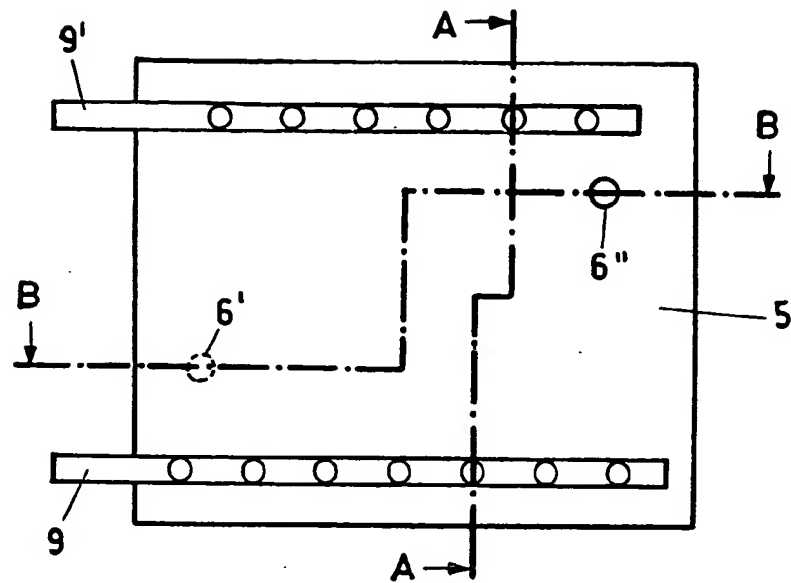


FIG. 2

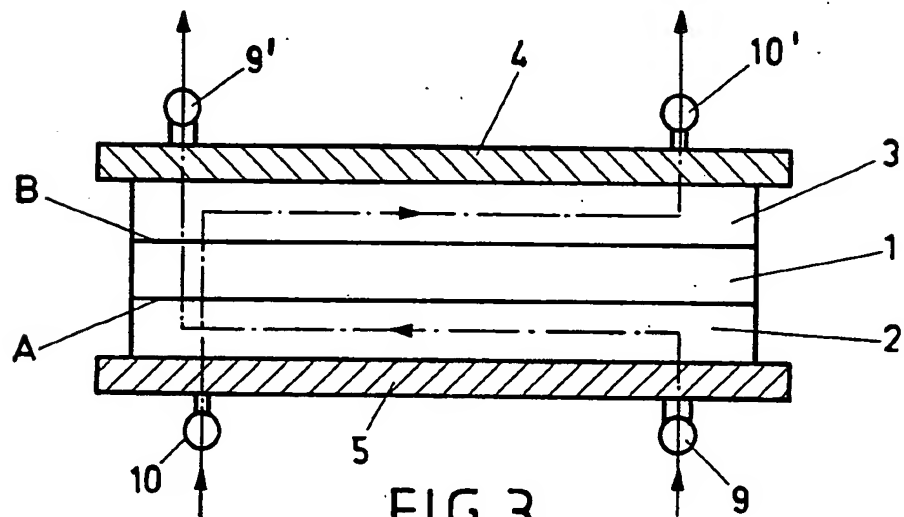


FIG. 3

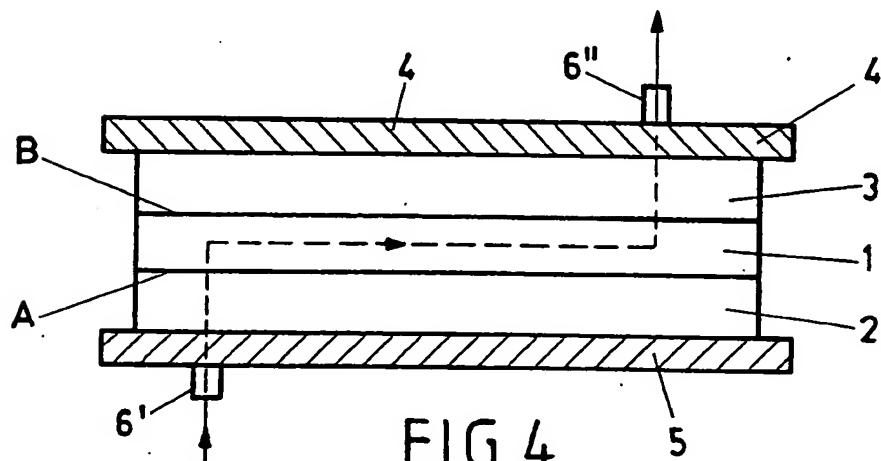


FIG. 4

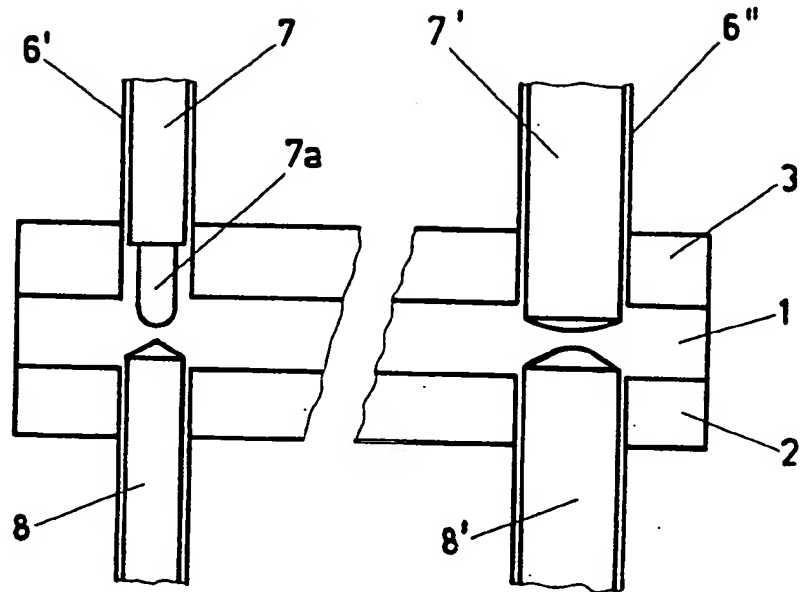


FIG. 5

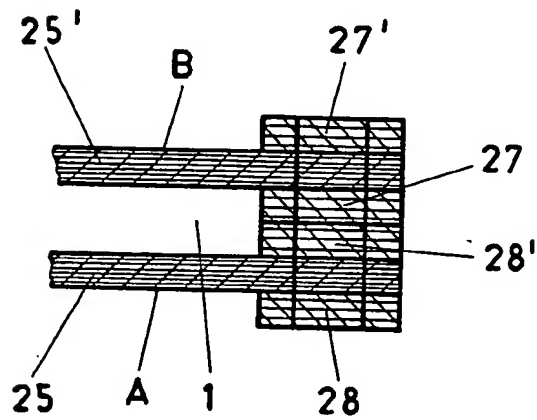
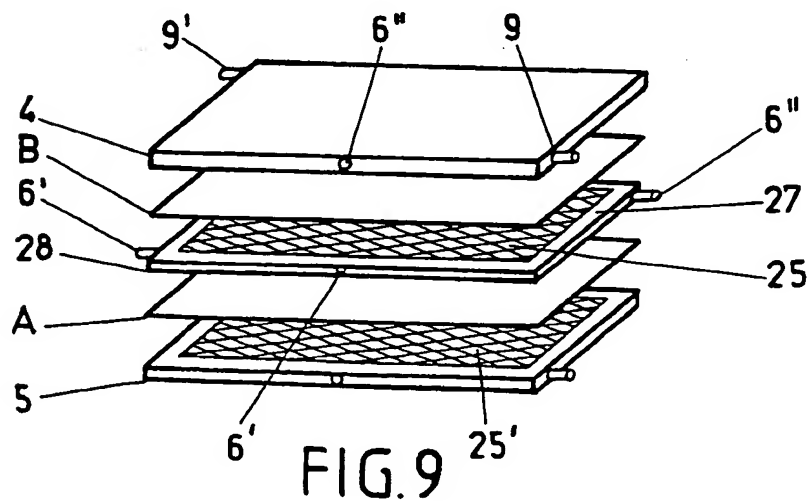
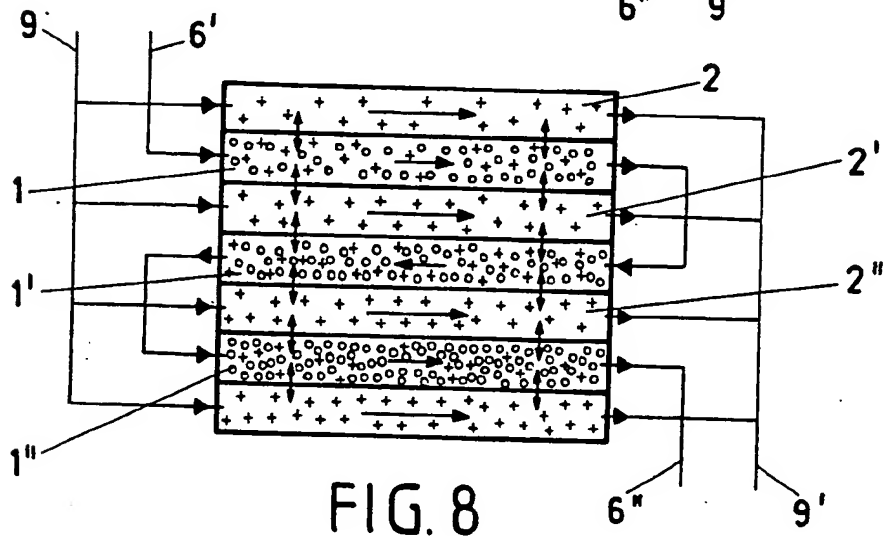
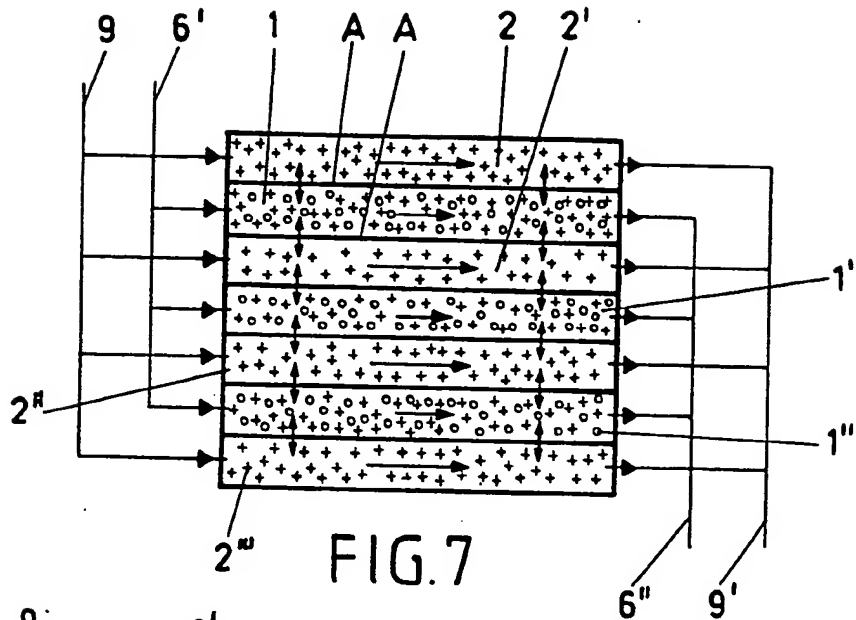


FIG. 6



PUB-NO: EP000155237A2
DOCUMENT-IDENTIFIER: EP 155237 A2
TITLE: Process and apparatus for the culture of human, animal, plant and hybrid cells and microorganisms.
PUBN-DATE: September 18, 1985

INVENTOR-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
KATINGER, HERMANN DR	N/A
SCHEIRER, WINFRID	N/A

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
MBR BIO REACTOR AG	CH

APPL-NO: EP85810103
APPL-DATE: March 11, 1985

PRIORITY-DATA: DE03409501A (March 15, 1984)

INT-CL (IPC): C12M003/02 , C12M001/12

EUR-CL (EPC): C12M001/12 , C12M003/06

US-CL-CURRENT: 435/297.2

ABSTRACT:

1. Process for the culture of human, animal, plant and hybrid cells and micro-organisms in a bioreactor having at least three adjacent chambers, whereby at least one first chamber is a cell culture chamber (1), a second chamber is a medium chamber (2) and a third chamber is a product chamber (3), and the individual chambers are delimited from one another by membranes (A, B), characterised in that the cells are immobilised within the cell culture chamber (1) on carriers of net-like tissues (25, 25') which mechanically support the membranes (A, B), and in that their frame-like edges (27, 27', 28, 28') serve as a seal and simultaneously as spacers, whereby a medium chamber (2) containing nutrient solution enriched with an oxygen-containing gas is continuously flowed through in its longitudinal direction, and in that the product is only drawn off from the cell culture chamber (1) discontinuously.

PTO-92-2480

GERMAN
No. 155,237 A2

METHOD AND PROCEDURE FOR THE CULTIVATION OF HUMAN,
ANIMAL, PLANT AND HYBRID CELLS AND MICROORGANISMS

Hermann Katinger and Winfrid Scheirer

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
Washington, D.C. June 1992

<u>Country</u>	:	Germany
<u>Document No.</u>	:	155,237 A1
<u>Document type</u>	:	European Patent
<u>Language</u>	:	German
<u>Inventors</u>	:	Hermann Katinger and Winfrid Scheirer
<u>Applicant</u>	:	MBR Bio Reactor AG
<u>Representative</u>	:	Peter Johannes Hermann et al. c/o PPS, Polyvalent Patent Service AG Mellingerstrasse 1, CH-5400 Baden (CH)
<u>IPC</u>	:	C 12 M 3/02, C 12 M 1/12
<u>Application No.</u>	:	85810103.3
<u>Application date</u>	:	March 11, 1985
<u>Priority date</u>	:	March 15, 1984
<u>Priority country</u>	:	Germany
<u>Priority No.</u>	:	3,409,501
<u>Date of publication of the application</u>	:	September 18, 1985 Patentblatt 85/38
<u>Designated contracting states</u>	:	AT, BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE
<u>Foreign language title</u>	:	Verfahren und Vorrichtung zum Kultivieren von humanen, tierischen, pflanzlichen sowie hybriden Zellen und Mikroorganismen
<u>English title</u>	:	METHOD AND PROCEDURE FOR THE CULTIVATION OF HUMAN, ANIMAL, PLANT AND HYBRID CELLS AND MICROORGANISMS

METHOD AND PROCEDURE FOR THE CULTIVATION OF HUMAN,
ANIMAL, PLANT AND HYBRID CELLS AND MICROORGANISMS

The invention relates to a method and a setup for the cultivation of human, animal, plant and hybrid cells and microorganisms in a bioreactor with at least three adjacent chambers, and with at least one first chamber being a cell growth chamber, a second chamber being a medium chamber, and a third chamber being a product chamber, and with separation between the different chambers being achieved by membranes.

Cells of high eukaryotes (animal cells, human cells, plant cells and microorganisms) have the following characteristic properties in vitro:

- growth in complex nutrient media.
- high sensitivity against mechanical and hydraulic shearing effects.
- high sensitivity against physical and chemical environmental influences.
- considerable dependency on balanced supply of nutrients and removal of metabolic products.
- the kinetics of product formation can either be connected with cell growth or it can occur independently of cell growth.
- the products are either excreted or associated with the cell. /2

*Numbers in margin indicate pagination in the foreign text

During the raising of cells, the cells are supplied with nutrients from the surrounding nutrient medium. The metabolic products of the cells are released into the medium. When the liquid nutrient medium which contains the cells is motionless in a container, then the cells deposit because of their higher specific weight on the floor of the container and/or they deposit on the container walls. The resulting high cell densities cause diffusion for resupply of nutrient or for the removal of metabolic products to be insufficient and the cells die off. However, to reach high cell densities, as is often desired in production processes, it is necessary to provide resupply of nutrients and/or exchange or regeneration of the medium. Traditionally, the cell suspension had to be either cultivated in very thin layers or care had to be taken to constantly maintain the suspension, or there was the possibility of separating the cells for a short time from the medium during the resupply of medium or medium exchange.

In connection with the low mechanical and chemical tolerance of the cells, the required steps of stirring, filling, centrifuging, filtering, maintaining sterility, etc. raised great problems in the transfer of such cultivation methods from the laboratory scale to industrial and large-size industrial installations.

In all the known procedures, in which nutrients are added via semipermeable membranes or metabolic products are removed through such membranes, the cells are moved together with the culture medium, and as a rule this process is conducted by circulation

pumping. The circulating pumping of cells, however, leads to mechanical stress applied to the cells, which are thus damaged.

The purpose of the invention is, using largely natural /3 conditions, to achieve the supply of nutrients and the removal of metabolic products while avoiding mechanical and chemical effects.

The above-mentioned task is accomplished by the invention by the use of a nutrient-solution containing medium chamber through which there is a longitudinal flow and by the fact that the cell growth chamber as well as the subsequent product chamber with its content are relative motionless with respect to the flow velocity of the nutrient solution.

The cells are cultivated in cell growth chamber, whose space is limited by the two opposite membranes and by additional holding installations, attachments, etc.

On the exterior side of the membranes of the cell growth chamber there are also chambers which are either filled completely or partially with nutrient medium. The supply of nutrient medium preferably occurs through pores of the membrane or diffusion or mass flow. A direct supply of nutrient medium to the cell growth chamber is also possible. It is also possible to remove products from the cells through the membrane or--as selected by selecting the permeability of the membrane--to retain the products in the culturing space. The media can be piped continuously or discontinuously through the chambers, and the medium can be conditioned (treated chemically or physically, etc.) either outside or inside the medium chamber.

The fixation of the cells to support elements is particularly advantageous, preferably using fabrics in the form of nets. This has the advantage that the fixation of the cells requires no biocarriers, instead the net itself can be used as cell carrier.

For the implementation of the procedure it is appropriate, according to Claim 3, to connect one cell growth chamber through one membrane in each case both with the product chamber as well as with the nutrient medium chamber. /4

The culture chambers can be constructed in the form of stacks with shared inlet and outlet lines, and, as minimum function unit, one can use either a two-chamber system (medium/cells) or a three-chamber system (medium/cells/product). The number of chambers in a stack can, however, be selected at will. The surface area of the culture chambers is limited by the production-dependent maximum size of the membranes.

In a cell growth chamber it is possible to use two membranes with different pore sizes. The pore size of the membrane between cells and nutrient medium should be selected in such a manner that a nutrient exchange can take place and the membrane between the cells and the product chamber should be selected so that only metabolic products can pass through to the product side.

The membranes can be made of any usable material and can have any pore size. They can be symmetrical or asymmetrical, polar or apolar, hydrophilic or hydrophobic, and their strength must be adapted to the system. The membranes, however, must be constructed in such a manner that the cells are essentially held back. The

criteria listed also apply to gas-permeable membranes. The height of the chamber between the membranes, which are preferably arranged horizontally, is limited by the nutrient medium supply and the desired cell densities. The culture chamber can be provided with inserts for the bracing of the membranes, and/or for the generation of convection and/or for controlled guidance of the suspension. The medium chambers are limited in their volumes only by the desired throughflow or the guidance installations for the control /5 of convection and flow and the desired volume.

The total exchange (supply and removal) of gases, such as O_2 , CO_2 , etc., can either be achieved by external or internal enrichment in the culture medium in dissolved form or as a gas/liquid dispersion, but it can also be conducted using gas-permeable membranes of any shape. This can either occur analogously to the media flows or through the inserted membranes, for example hose-shaped membranes, which can be led through the culture chambers and which function simultaneously as bracing nets for flat membranes and/or carriers for the cells.

According to Claim 4, it has been shown to be advantageous to select pore sizes for the membranes between the medium and the cell growth chamber which are such that substances with particle sizes above 100,000 daltons no longer can pass through the membranes.

For the membranes between the product chamber and the cell growth chamber, according to Claim 5, it is appropriate to select a pore size between $0.1\ \mu m$ and $0.6\ \mu m$, preferably $0.2\ \mu m$.

According to Claim 6, it is appropriate to install the membranes in the cell growth chamber at an interval of 0.3 to 10 mm. It has been shown to be particularly advantageous to select a 0.5-mm separation between the two membranes because the thickness of the nets used as carriers for the cells is also 0.5 mm and thus they fill the entire cell growth chamber with their texture.

According to Claim 7, it is appropriate to introduce measurement probes into the lines used for the introduction of a cell suspension and for harvesting. These lines are led at a right angle through all chambers, with the head of a measurement sensor being attached approximately in the middle of a cell growth chamber. Particularly probes for pH, pO_2 are provided. /6

For the attachment of the probes, according to Claim 8, it has been shown that rigid setting bolts are particularly advantageous, which are introduced from the opposite side of the line and attached in such a manner that they limit the location of the measurement probes. By the rigid setting bolts the dead volume in the line leading to or away from the cell growth chamber is reduced.

Fabrics which have a net-shaped texture have been shown to be particularly advantageous as carriers, according to Claim 9, for the immobilization of the cells.

According to Claim 10, appropriate cell carrier nets are made of plastics, particularly fluorohydrocarbons.

According to Claim 11, nets with diamond-shaped openings are particularly advantageous. In this case the cells become attached

to the fabric threads and they leave a central opening for substance exchange.

The invention will be described in further detail using an example and with reference to the drawings, in which:

Figure 1 shows a diagrammatic representation of the principle of the procedure with a cutout of the apparatus according to the invention,

Figure 2 shows a ground plan of a cell growth apparatus according to Figure 1,

Figure 3 is a cross section through A-A of Figure 2,

Figure 4 is a cross section through B-B of Figure 2,

Figure 5 shows the arrangement of the probes in the cell growth /7 chamber,

Figure 6 is an enlargement in the area of the attachment of the membrane,

Figure 7 is a diagrammatic representation of a two-chamber system,

Figure 8 is a diagram of a three-chamber system and

Figure 9 is a perspective view of the construction of the cell growth apparatus.

According to Figure 1, a cell growth apparatus, in its most simple embodiment consists, each, of a cell growth chamber 1, which is enclosed by medium chamber 2 and product chamber 3. In Figure 2, additional cell growth chambers 1', 1'', one additional medium chamber 2' and one additional product chamber 3' are shown. The apparatus is expandable as desired depending on needs. The three

chambers are limited by a covering plate 4 and a bottom plate 5. The individual chambers are sealed with maintenance of sterility by membranes and seals attached on their sides. In a line 6 for cell inlet and cell harvesting, probes 7 or 7' are provided for the measurement or the control of pH and pO_2 . For the attachment of the probes for example inside cell growth chamber 1' rigid setting bolts 8 or 8' are provided. The cell growth apparatus is provided with attachments 9, 9' for a nutrient medium as well as attachment 10, 10' for the product. A container 11 for the preparation of the nutrient medium is connected through line 12, metering valve 13, pump 14, valve 15 and flexible line 16 with connection 9 at the cell growth apparatus. Through line 17 the circulating medium is returned into container 11. Container 11 is connected with a temperature regulation 18 as well as a gas introduction installation 19. The gas introduction station 19 contains an inlet/8 line 20 for air and an inlet line 21 for carbon dioxide. Between gas introduction station 19 and container 11, an air inlet filter 22 and, in the exhaust air line 23, an exhaust air filter 24 are provided.

Figure 2 shows the floorplan of the cell growth installation according to Figure 1 with floor plate 5, connection 9 for the medium inlet and connection 9' for the medium removal from and to medium chambers 2 and 2' as well as connections 6' and 6" to the cell growth chambers 1, 1', and 1".

In Figure 3, cell growth chamber 1, medium chamber 2 and product chamber 3 is attached between the covering plate 4 and the floor

plate 5. Between the cell growth chamber 1 and medium chamber 2 a membrane A is provided, and between product chamber 3 an additional membrane B is provided. The inlet of the medium occurs through connection 9 and the removal of medium through connection 9'. Connection 10 is provided for the inlet of product and connection 10' for the outlet of product. Both the medium flow as well as the product flow are indicated by point-dotted lines with arrows.

In Figure 4, connection 6' is provided for the inlet of the cell suspension and connection 6" for the outlet of the cell suspension. Here the path of the cell suspension is also indicated by a point-dot line.

Figure 5 shows the arrangement of probes 7, 7' in inlet brace 6' and outlet brace 6" of the cell growth chamber 1, limited for the attachment in their penetration depth by rigid setting bolts 8 and 8'. A measurement head 7a is located in the middle of cell growth chamber 1.

Figure 6 shows the attachment of membranes A, B and of fabrics 25, 25', which are used for the immobilization of the cells [and] microorganisms. The attachment occurs by clamping at the periphery, with sealing material 27, 27' and 28, 28' applied to the fabric serving simultaneously for maintaining the separation distance.

Figure 7 shows the diagram of a two-chamber system, in which nutrient inlet and product outlet occur through similar membranes A. The nutrient medium circulates through connections 9 with branches into medium chambers 2, 2', 2", 2"' to connection 9'. The

cell growth chambers 1, 1', 1" are provided with membranes A. The cells are introduced through connection 6' into the cell growth chambers and after completion of growth or for other reasons they are harvested through connection 6".

In Figure 8, the medium inlet and the product outlet occurs in a similar manner to that shown in Figure 7. The cell growth chambers in contrast are connected one after each other by appropriate line connections.

Figure 9 shows an opened cell growth chamber with covering plate 4 and bottom plate 5. Between membranes A and B fabrics 25 are provided with the texture according to the invention which functions simultaneously as a bracing fabric for the membranes and as carriers 25 or 25' for the cells.

The method of operation is explained on the basis of Figure 1. After the construction of a cell growth apparatus consisting of cell growth chambers 1, 1', 1", medium chambers 2, 2', product chambers 3, 3' as well as covering plate 4 and bottom plate 5, and membranes A and B as well as the nuts attached between the membranes in cell growth chambers 1, 1', 1" (Figure 9), the sealing properties of the apparatus are checked and sterilization with steam is conducted using the known methods. For the immobilization of the cell, a cell suspension is [illegible] through line 6' of the left side [,] cell growth chambers 1, 1', 1" and outlet lines 6a on the right side of the apparatus using a corresponding inoculation container which is not represented, until all the cells are fixed to the nets.

At the same time, a nutrient solution prepared in container 11 /10 is recirculated as medium by means of pump 14 through line 16, connection 9, medium chamber 2 and 2', collecting line 9', line 17 into container 11. The quantity of the medium flow is set with valve 13. The introduction of gas into the nutrient medium occurs by means of a gas introduction apparatus 19, which comprises a metering unit for the addition of air through line 20 and CO₂ through line 21. These gases are subjected to sterilization-filtration before the introduction into container 11 through the air inlet filter 22. Exhaust gases from container 11 can escape through exhaust gas filter 24.

Through connection 10, on the product side, it is possible to line an appropriate fluid for the continual removal of metabolic products from cell growth chambers 1, 1', 1". This fluid flows through product chambers 3 and 3' and it leaves the cell growth installation through connection 10'. The product can also be removed discontinuously, in that case during the cell growth operation the valves to connections 10 and 10' remain closed until sufficient products have accumulated through permeation through the membranes in product chambers 3 and 3', which is under pressure and which can be removed through line 10' if needed or for harvesting.

The mode of operation of the culture chambers can be regulated optimally to the production kinetics of each case. This is guaranteed by the fact that a desired degree of immobilization of the cells is achieved and both the cell side as well as the side of the medium and possibly of the product can be subjected to

continuous or discontinuous flow. The advantages of the known method for cell immobilization, for dialysis culture and perfusion cultures can be combined with the method of batch culturing, with the single-current or multi-current continual mode of operation. It is therefore possible to select the optimal mode of operation /11 for each case of production kinetics. The procedure according to the invention can be used for biocatalytic conversion of substrates to products. The procedure according to the invention is easy to handle and it provides better possibilities of control as well as the possibility of controlled throughflow and measurement in the culture space. In comparison to the complicated procedure of microencapsulation, considerably simpler and smaller installations guarantee a better possibility of control and produce equally good or better results.

Example

The culture chambers are fitted with polysulfon with a pore size of 0.2 μm , the inlet and outlet lines for the culture and medium chambers are arranged together in parallel and the apparatus is sterilized.

The culture chambers are filled with a cell suspension of the hybridoma cell line C28. This is a hybridoma cell line produced from primary human cells and a mouse myeloma cell line. It produces human IgG1 and it separates the latter from the surrounding medium. This culture medium consists of 90% Dulbecco MEM and 10% fetal calf serum. The initial cell density is 500,000 cells/mL. The cultivation temperature is 36.5°C. In the medium

lines, culture medium, which has been enriched with air by means of an air lift pump, is circulated by pumping and daily subjected to flow with a volume equivalent to the culture chamber volume. After three days a cell density of 1.8×10^6 cells/mL is reached, and the IgG1 concentration on the medium side is approximately 30 mg/liter. The cell concentration gradually increases to approximately 100 mg/liter and it stabilizes after an additional week.

By the method of the invention, sufficient quantities of nutrients are led to the cells in a mild manner and metabolic /12 products are removed. A harmful physical or chemical effect can be kept away from the cells by the membranes. By the arrangement of membrane chambers in stacks a high use of volume is given and thus the possibility of reaching culturing magnitudes of industrial relevance in a unit operation.

Patent Claims

/13

1. Method for the cultivation of human, animal, plant or hybrid cells and microorganisms in a bioreactor with at least three adjacent chambers, with at least one first chamber being a cell growth chamber (1), a second chamber being a medium chamber (2) and a third chamber being a product chamber (3), and the individual chambers are separated from each other by membranes (A, B), characterized in that a nutrient solution containing medium chamber (2) is subjected to a longitudinal flow through it and that the cell growth chamber (1) as well as the adjacent product chamber (3)

with its content is in relative motionlessness with regard to the flow velocity of the nutrient solution.

2. Method according to Claim 1, characterized in that the cells are immobilized inside the cell growth chamber (1) at the carriers made of netlike fabrics (25, 25').

3. Apparatus for the implementation of the method according to Claims 1 and 2, characterized in that at least one cell growth chamber (1) is in connection through membrane (B) with a product chamber (3) and through an additional membrane (A) with a medium chamber (2) and in that membranes (A) and membranes (B) have different pore sizes.

4. Apparatus according to Claim 3, characterized in that the membrane (A) has an exclusion limit of 100,000 daltons.

5. Apparatus according to Claim 3, characterized in that /14
membrane (B) has a pore size of $0.2' \mu\text{m}$.

6. Apparatus according to Claim 3, characterized in that membranes (A, B) in the cell growth chamber (1) have an interval of 0.3 to 10 mm.

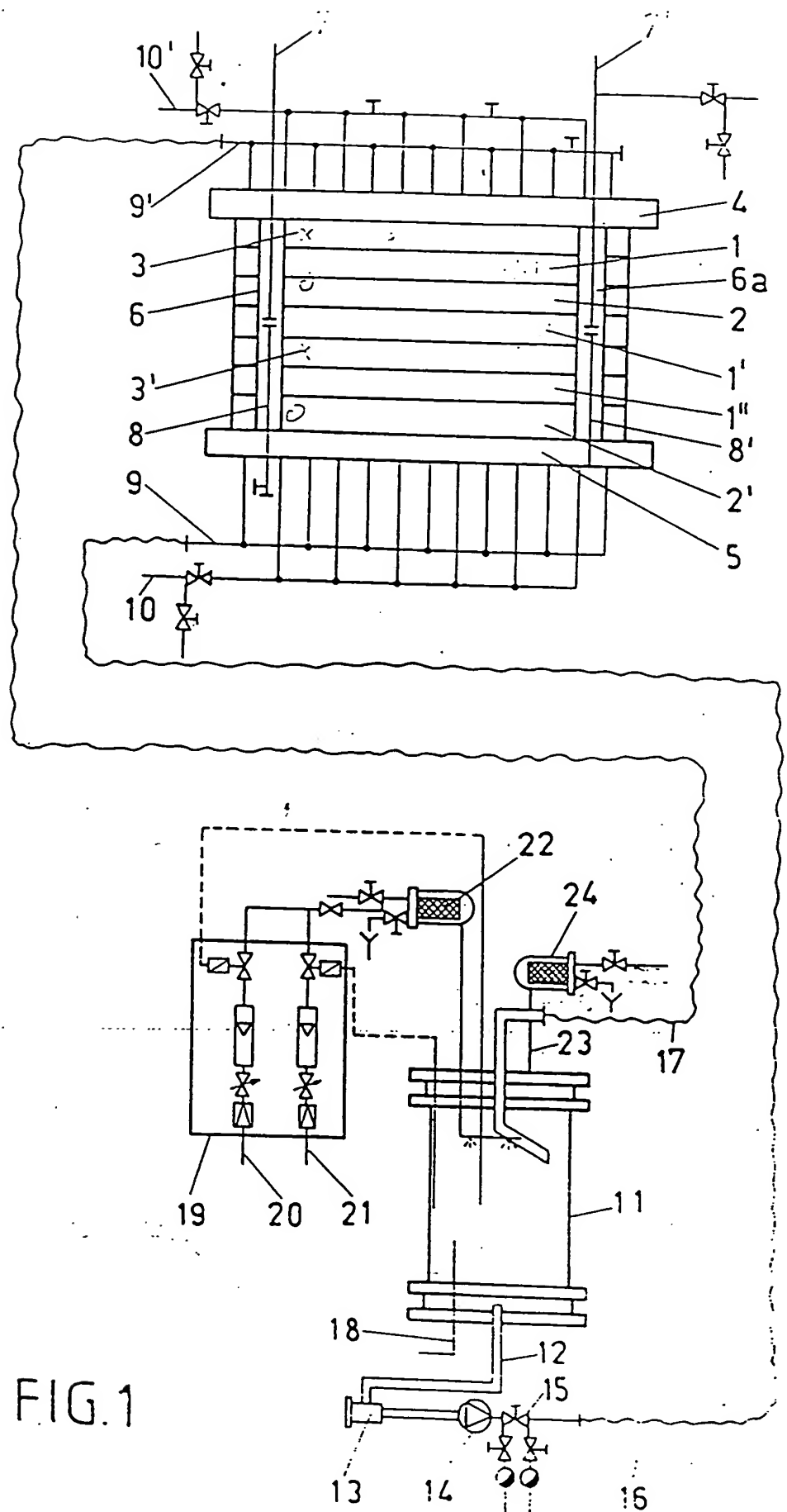
7. Apparatus according to Claims 3 through 6, characterized in that a measurement probe (7) is attached by means of attachment stud (6') which runs perpendicularly through the two chambers (2, 3) adjacent to cell growth chamber (1), and in that an additional measurement probe (7') is attached by means of attachment stud (6'') with measurement head (7a) inside of cell growth chamber (1).

8. Apparatus according to Claim 7, characterized in that the measurement probes (7, 7') are attached by means of rigid setting bolts (8, 8').

9. Apparatus according to Claims 1 through 8, characterized in that netlike fabrics (25, 25') are attached between the two membranes (A, b) of cell growth chamber (1).

10. Apparatus according to Claim 9, characterized in that the netlike fabrics (25, 25') are made of plastic fabric.

11. Apparatus according to Claim 10, characterized in that the netlike fabrics (25, 25') exhibit diamond-shaped openings.



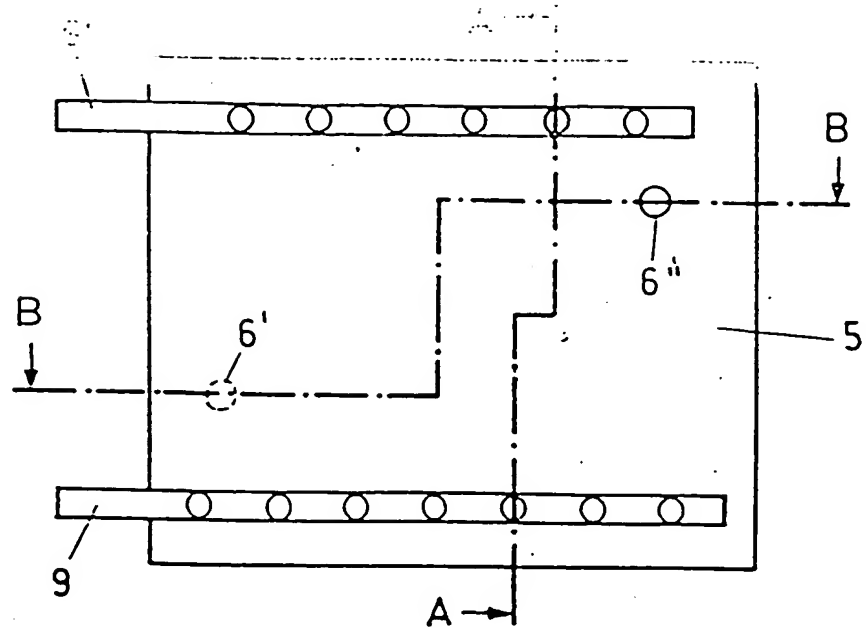


FIG. 2

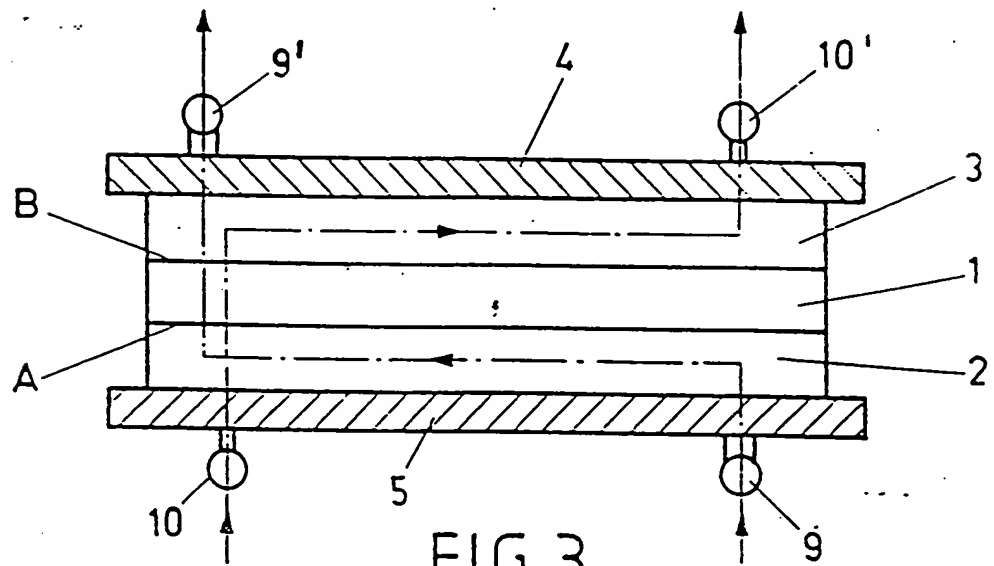


FIG. 3

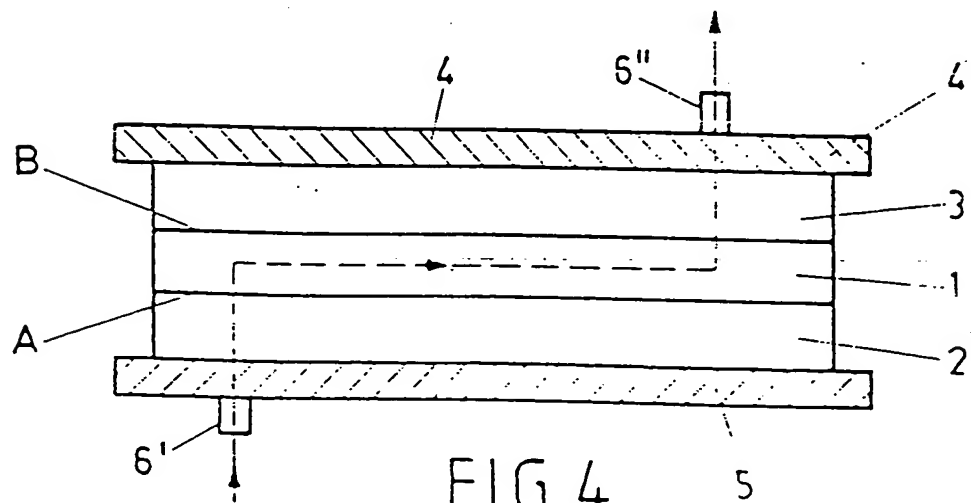


FIG. 4

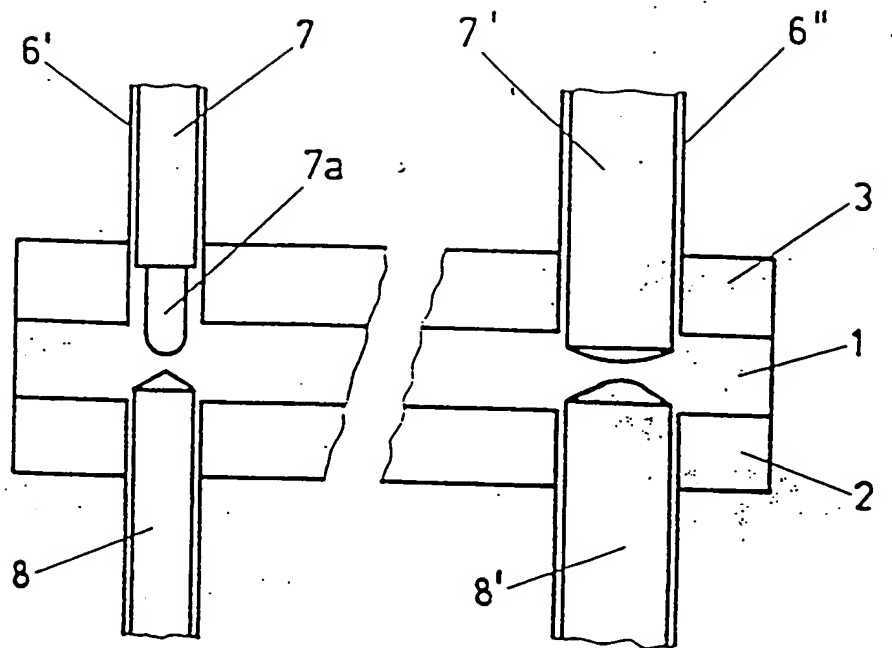


FIG. 5

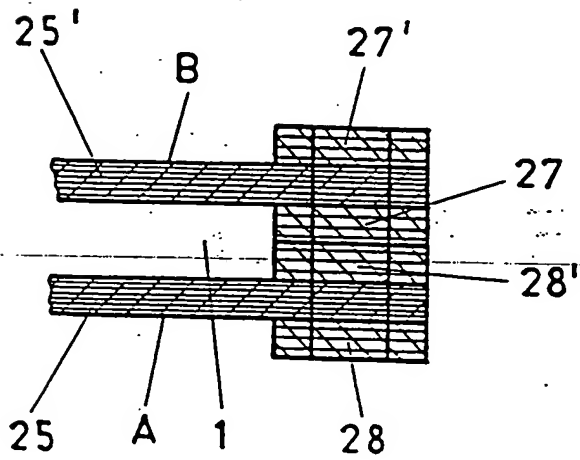


FIG. 6

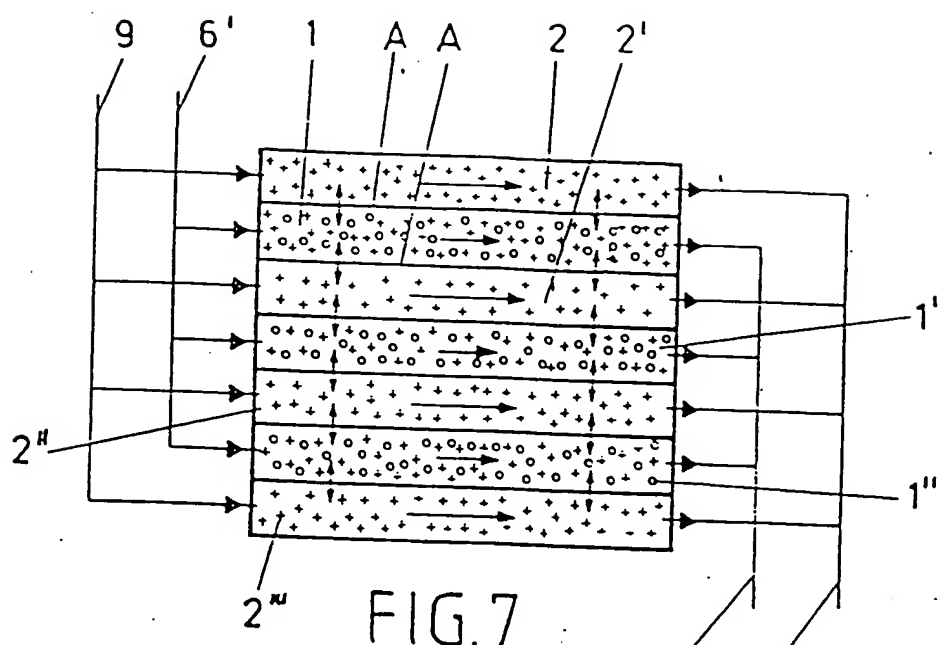


FIG. 7

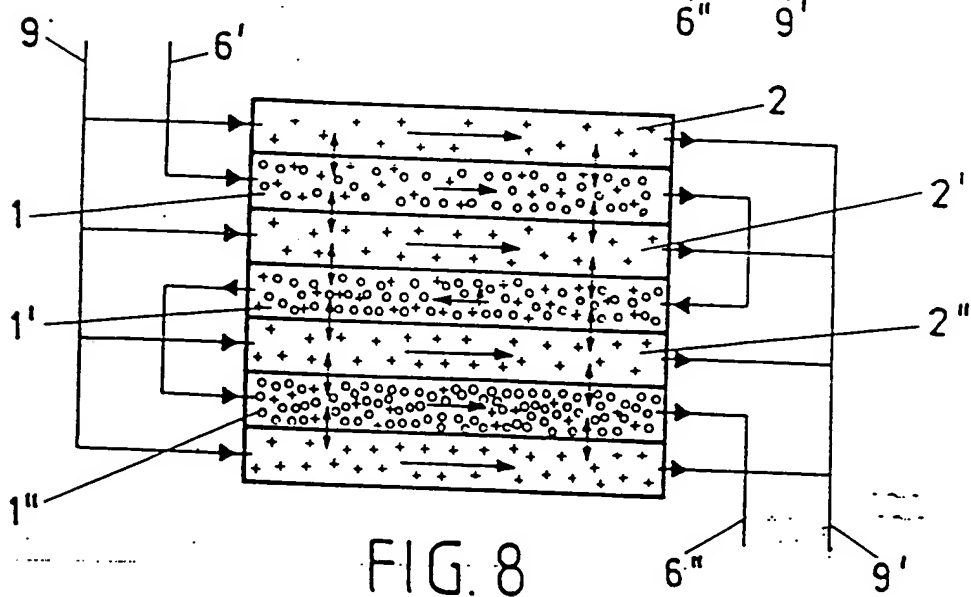


FIG. 8

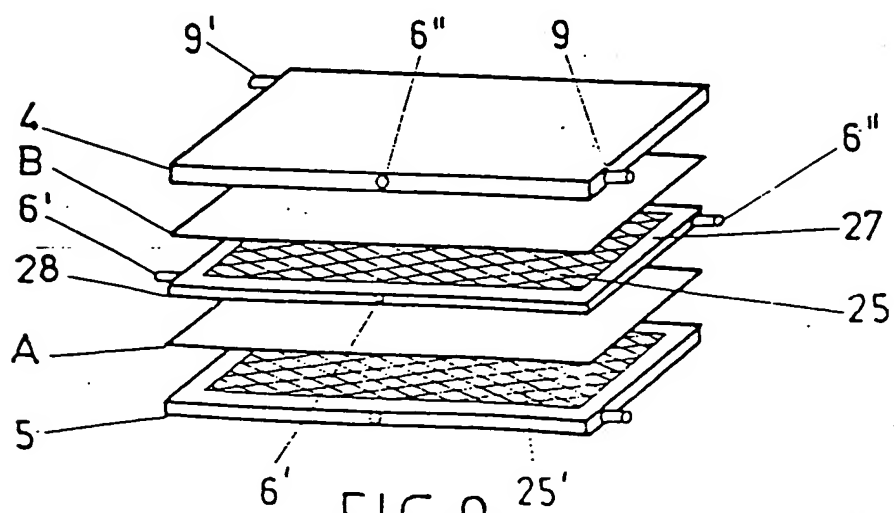


FIG. 9